

Recherches sur l'aflatoxine

Revue des travaux effectués pendant le premier semestre 1964 dans les Laboratoires centraux de l'I. E. M. V. T.

par J. P. PETIT, R. RIVIÈRE, P. PERREAU et J. PAGOT

RÉSUMÉ

Les recherches entreprises aux Laboratoires centraux de l'I. E. M. V. T. visent à permettre des études toxicologiques et pharmacologiques ultérieures. Différentes sources d'aflatoxine sont envisagées, notamment des cultures sur maïs grain qui ont produit de la toxine.

Les auteurs indiquent les méthodes d'extractions à tous les stades et le moyen d'homogénéiser l'extrait brut par de l'éthanol absolu ; pour détecter la toxicité et suivre les extractions et les purifications, ils exposent en détail deux épreuves : biologique sur canetons et physico-chimique par fluorescence après chromatographie. Ils décrivent une méthode simple pour photographier les chromatogrammes fluorescents et donnent des exemples de ce qu'elle permet d'obtenir. On peut donc classer les résultats obtenus, les revoir à tout moment, les comparer et effectuer, par projection sur écran, des mesures précises de R_F .

Cette technique est particulièrement efficace, associée à la chromatographie en couche mince dont les modalités sont analysées du point de vue de la reproductibilité des résultats obtenus.

La confrontation des données de toutes ces analyses permet une mise au point des techniques à utiliser pour des recherches futures sur ce sujet particulièrement important au point de vue économique.

Les laboratoires de l'I. E. M. V. T. ont été amenés à étudier la toxicité des tourteaux d'arachides envahis par les moisissures du genre *Aspergillus* (*A. flavus* Link) et contenant leurs toxines, les aflatoxines, responsables de nombreux accidents en pathologie vétérinaire, notamment chez les porcs.

Dès 1960, en effet, avait été observée à Madagascar, une maladie enzootique qui, dans plusieurs élevages importants, décimait les truies et parfois les verrats. Des mortalités élevées apparurent également en 1962 sur des porcs en croissance, âgés de 4 à 10 mois (7).

Les examens anatomo-pathologiques montraient, dans tous les cas, une atteinte grave du foie et l'histologie révélait des lésions de dégénérescence orientant le diagnostic vers une

intoxication ou une toxi-infection.

Les recherches faites au Laboratoire Central de Recherches vétérinaires malgache géré par l'I. E. M. V. T. permirent d'éliminer les causes infectieuses et parasitaires et d'incriminer l'alimentation et plus particulièrement les tourteaux d'arachide, que les éleveurs introduisaient en quantité très importante dans les rations (29, 31, 33).

Les tourteaux malgaches sont des « expellers » contenant encore près de 10 p. 100 de matières grasses et leur rancissement est rapide ; le taux excessif d'acides gras polyinsaturés pouvait être rendu responsable des troubles observés.

Les travaux des chercheurs britanniques permirent, après 1961, d'attribuer les accidents

à la présence d'aflatoxine dans ces tourteaux.

Les recherches des laboratoires centraux de l'I. E. M. V. T. avaient pour but l'extraction ou la production, puis la purification d'une quantité d'aflatoxine suffisante pour permettre des études de toxicologie, sur petits et grands animaux et des analyses sur la nature des différents composants de cette toxine.

Une application directe de ces recherches serait, dans l'immédiat, la mise au point d'un procédé commode de détection de l'aflatoxine dans les produits utilisés pour l'alimentation animale, en particulier dans les tourteaux d'arachide.

I. — SOURCES D'AFATOXINE

1^o Tourteaux : Nous avons utilisé d'abord des tourteaux d'arachide réputés toxiques. C'est d'ailleurs l'approvisionnement en un tel matériel qui s'est révélé l'obstacle principal au développement des recherches.

Celles-ci ont pu commencer grâce à l'arrivée d'un échantillon de 15 kg en provenance de Madagascar, où ce tourteau avait provoqué des accidents et la mort expérimentale de canetons.

2^o Manioc : Une équipe chargée d'une enquête sur les aliments du bétail dans les pays de l'Afrique occidentale avait également pour mission de trouver des produits contaminés par des moisissures. Elle n'obtint que deux échantillons de manioc moisi.

3^o Cultures : Ces difficultés d'approvisionnement rencontrées avec les sources naturelles d'aflatoxine nous incitèrent à rechercher si des cultures d'*Aspergillus* pouvaient fournir des quantités suffisantes de toxine.

a) Souches d'*Aspergillus flavus* Link :

— Deux souches furent employées : l'une provenait de la collection de l'I. R. A. T. l'autre de Madagascar, isolée à partir du lot de tourteau toxique sur lequel avait été déjà prélevé l'échantillon de 15 kg qui servit aux premiers essais.

— Toutes deux furent conservées sur gélose à l'extrait de malt, sans précautions spéciales.

b) Cultures :

1) Sur milieux liquides.

Le milieu classique de CZAPEK a été le premier expérimenté :

6 ballons d'un litre ont étéensemencés copieusement avec la souche de l'I. R. A. T. ; après 10 jours à 22-24° C, période au cours de laquelle plusieurs cycles de fructification s'étaient effectués en surface, cette culture a été filtrée et le filtrat s'est révélé non toxique pour le caneton, même après une forte concentration par évaporation (Rotovapor), bien qu'une fluorescence ait été ensuite décelée.

La même souche a étéensemencée de façon identique sur milieu à l'extrait de malt OXOID ; une culture de 10 jours, très abondante a été filtrée, puis concentrée par évaporation.

La chromatographie et l'examen en lumière ultra violette montrèrent que cette préparation était pauvre en aflatoxine et elle fut abandonnée.

2) Sur milieux solides,

Après ces insuccès la souche de Madagascar fut demandée au Laboratoire de l'I. E. M. V. T. à Tananarive. Elle n'est pas encore passée sur milieu liquide, car il a été jugé préférable, avant toute expérimentation, d'éprouver le caractère toxigène de ces deux souches en utilisant simplement la culture sur grain de maïs, réputée pour donner une production suffisante d'aflatoxine (bien que l'extraction en soit ensuite fastidieuse).

Douze boîtes de ROUX (pour chaque souche) contenant chacune environ 80 g de maïs stérilisé, très légèrement humide, ont étéensemencées avec une suspension de spores.

L'envahissement mycélien et la production conidienne sont excellents à condition que les boîtes ne soient bouchées qu'avec un tampon de gaze assez lâche ; une aération satisfaisante est donc indispensable. Après une semaine de culture, les boîtes ont été autoclavées 30 minutes à 100° C.

Une partie des graines a été soumise à l'extraction chloroformique et l'autre partie, destinée à l'alimentation de canetons sous forme de bouillie, a été broyée.

II. — LES MÉTHODES D'EXTRACTION

a) Tourteau toxique de Madagascar :

La technique du Tropical Products Institute,

décrite par SARGEANT et ses collaborateurs fut utilisée (8). Le tourteau délipidé à l'éther, subit une extraction par le méthanol ; le résidu obtenu est dilué dans de l'eau distillée et le mélange subit une 2^e extraction chloroformique ; l'extrait noirâtre recueilli après évaporation du solvant est dissous dans un mélange éther de pétrole-méthanol-eau, puis agité énergiquement et mis à décantier ; la phase méthanolique inférieure est traitée à deux reprises par de l'éther de pétrole, puis évaporée sous pression réduite.

Le résidu pâteux final, qui constitue l'extrait brut, très épais, d'environ 3 g pour 800 g de tourteau est dilué dans 40 ml d'eau distillée ; 1 ml de la solution correspond à 20 g de tourteau. Le produit obtenu se présente sous l'aspect d'une pâte assez peu fluide, de couleur noirâtre due à la présence en grande quantité de pentosanes et de polysaccharides extraits par le méthanol. Cet extrait est peu miscible à l'eau, donne des solutions hétérogènes, contenant des particules insolubles collant au verre.

Cette méthode d'extraction par le méthanol ne donne pas entière satisfaction et d'autres techniques seront essayées.

b) Manioc moisi :

Les deux échantillons de manioc moisi ont été traités de la même façon, mais, le taux de matière grasse étant très faible (moins de 1 p. 100), ils n'ont pas été délipidés. Une fluorescence d'intensité moyenne a pu être décelée par chromatographie.

c) Cultures :

Les deux cultures sur maïs ont subi une simple extraction chloroformique pendant 6 heures dans des appareils de SOXHLET. Le solvant est évaporé sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. Le résidu est dissous dans un mélange de méthanol et d'éther de pétrole à parties égales. On ajoute 5 ml d'eau distillée et on agite fortement. Le tout est mis à décantier et la couche méthanolique est recueillie. L'extrait est obtenu par évaporation, sous pression réduite, du méthanol.

III. — LES EXPÉRIENCES SUR CANETONS

Les produits suivants ont été testés sur canetons « Pékin » de 2 jours :

- L'extrait brut de tourteau.
- Le tourteau entier.
- Une culture d'*A. flavus* (souche I. R. A. T.) sur milieu de CZÁPEK.
- Les 2 cultures d'*A. flavus* sur maïs en grain.

a) Première expérience :

— 4 canetons ont reçu, deux fois par jour et pendant 7 jours, 2 ml d'une dilution au 1/40 de l'extrait de tourteau, correspondant à 13 g de tourteau mais le mélange n'était pas d'une homogénéité parfaite.

— 4 canetons ont reçu, deux fois par jour, 3 ml de la culture sur CZÁPEK.

Aucune mortalité n'a été observée et les 8 canetons ainsi que 2 témoins ont été sacrifiés le 7^e jour.

b) Deuxième expérience :

— 5 canetons ont reçu le même extrait de tourteau, mais cette fois homogénéisé par addition d'une petite quantité d'éthanol absolu et dilué au 1/20, chaque ml correspondant à 13 g de tourteau, suivant le protocole suivant :

2 ml le 1^{er} jour, soit l'équivalent d'environ 26 g de tourteau ;

2 fois 2,5 ml les jours suivants, soit l'équivalent d'environ 32 g de tourteau ; 2 canetons sont morts le 3^e jour et les 3 autres le 4^e jour.

— 5 canetons ont reçu du tourteau complet à raison de 1 g le 1^{er} jour, 2 g les 2^e et 3^e jours, 3,5 g le 4^e jour ; 4 canetons sont morts le 4^e jour et le dernier le 5^e jour.

— 2 témoins ont été sacrifiés le 5^e jour.

c) Troisième expérience :

— 7 lots de 5 canetons ont été constitués :

Les deux premiers ont reçu les extraits des deux cultures sur maïs à raison de 2 ml, deux fois par jour, d'une dilution au 1/10 (2 ml correspondant à 5 g de maïs moisi).

Un sujet est mort le 6^e jour et un autre le 10^e jour, tous deux appartenant au lot n° 2 (souche isolée à Madagascar).

Les 8 survivants ont été sacrifiés le 15^e jour.

Les lots n° 3 et 4 ont reçu de façon parallèle du maïs contaminé, broyé après autoclavage et n'ayant pas subi d'extraction, à raison de 5 g par jour.

Aucune mortalité n'a été observée ; les canetons ont été sacrifiés le 15^e jour.

Les lots n° 5 et 6 ont reçu les maïs broyés ayant subi l'extraction, à raison également de 5 g par jour. Ils ont été sacrifiés, les uns le 15^e jour, les autres le 20^e jour.

Les examens macroscopiques (photographie n° 1) des foies ont permis de déceler deux types de lésions chez les canetons ayant reçu le tourteau, l'extrait de tourteau, les extraits de culture sur maïs (2^e souche) et le maïs entier (2^e souche) :

- Des lésions d'atrophie.
- Des lésions d'hypertrophie avec dégénérescence grasseuse et zones congestives.

Dans chaque expérience, les foies des animaux morts ou sacrifiés étaient prélevés et des fragments inclus dans la paraffine, en vue d'examens histologiques, qui ont révélé des cirrhoses dégénératives très significatives de la présence d'aflatoxine. *

Cette expérimentation a donné lieu à deux observations :

1^o Les sujets du 6^e lot de la 3^e expérience étaient à âge égal (15^e jour) nettement plus gros que les canetons des 6 autres lots.

Il serait donc possible de trouver dans certaines cultures d'*A. flavus*, des substances favorisant la croissance. Est-ce un ou plusieurs antibiotiques comme l'a signalé JACQUET (26) à propos de l'*A. clavatus* et WAKSMAN et ses collaborateurs à propos des *A. fumigatus* et *clavatus* ? S'agit-il de facteurs de croissance, par exemple d'acides aminés synthétisés au cours du métabolisme de ce champignon ? Ces hypothèses sont à l'heure actuelle sans confirmation précise.

2^o Ce test biologique rencontre les obstacles habituels :

- Difficulté d'un dosage précis.
- Hétérogénéité de populations, etc...

* Nous remercions vivement M. PARODI, chef de travaux d'anatomie pathologique à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, d'avoir bien voulu examiner les préparations histologiques.

L'administration des produits toxiques s'avère assez difficile et imprécise, car il est pratiquement impossible lors de l'administration de liquides (solutions d'extraits en l'occurrence) d'éviter les régurgitations incontrôlables, quelle soit le volume ingéré. D'autre part, si l'on veut faire ingérer des produits complets tels que tourteaux ou farine de maïs, on est obligé de se limiter à de petites quantités de l'ordre de quelques grammes.

Le test biologique sur canetons est donc réalisable dans des conditions définies. Il dépend directement de trois facteurs principaux : le mode d'extraction, l'homogénéisation de l'extrait brut et enfin des canetons eux-mêmes ; ces problèmes seront discutés plus loin.

IV. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE ET TESTS DE FLUORESCENCE

La réalisation de la dernière partie de la purification sur des échantillons d'origines diverses a permis de préciser plusieurs points :

— d'une part, la sélectivité de l'extraction et l'efficacité du passage de l'échantillon sur la colonne d'alumine neutre.

— d'autre part, la technique fixant définitivement l'image fluorescente, essentiellement fugace, pour rendre plus courantes les comparaisons de chromatogrammes et plus précises les mesures de R_f .

Nous désignerons désormais les extraits bruts utilisés ainsi :

- A. — Extrait de tourteaux d'arachide toxiques.
- B. — Extrait de culture sur milieu liquide de souches d'*A. flavus* (CZAPEK et extrait de malt).
- C. — Extrait de lots de manioc (907-906).
- D. — Extrait de cultures sur maïs en grain.

Techniques utilisées :

Pour la plupart d'entre elles, ces techniques sont déjà détaillées (dans leur forme standard) par les auteurs anglais. La photographie des chromatogrammes qui constitue une technique originale sera seule précisée.

1^o Chromatographie sur papier :

La méthode rapide utilisée pour les extraits bruts permet de répondre si oui ou non on peut penser à la présence d'aflatoxine.

Les chromatogrammes sont effectués dans des chromatotubes PLEUGER, par la méthode ascendante avec les solvants :

— Système 1 : Butanol, eau, acide acétique (20 : 1 : 19).

— Système 2 : Chloroforme, méthanol (95 : 5)

Pour le solvant 1, la saturation de la cuve s'effectue avec la phase inférieure et le développement avec la phase supérieure à la température de 24°C. Ce développement dure 20 heures, sur papier Whatman n° 1 en bande de 30 mm de large sur 550 mm de haut, le dépôt s'effectuant à 60 mm du bas de la bande et à 30 mm du niveau de départ du solvant.

Avec le solvant 2, saturation et développement sont effectués avec la même phase et durent respectivement 1 heure et 3 heures 30.

Quel que soit le solvant, on sèche à 100°C pendant 20 minutes. La lecture est effectuée dans la journée sous une lampe génératrice d'ultra-violet autour de 350 mμ en un lieu peu éclairé. On repère immédiatement au crayon les taches fluorescentes pour déterminer les R_F et on note l'intensité de la fluorescence ainsi que sa coloration. La seule véritable difficulté rencontrée avec cet appareillage est de placer correctement la bande de papier pour que non seulement elle ne touche absolument pas les parois en verre, mais encore qu'elle leur soit parallèle.

2^o Chromatographie sur couche mince :

Les supports sont établis avec l'applicateur « Camag » sur plaque de verre 10 × 20 ou 5 × 20 en couche allant de 0,30 à 0,65 mm d'épaisseur. Les supports ont été l'alumine et le gel de silice Camag avec et sans liant, le Kieselguhr et la poudre de cellulose PLEUGER.

Lors de chaque expérience, les plaques étaient activées par chauffage à 100°C pendant 1 heure, mais auparavant elles séchaient à l'air pendant un temps suffisant pour qu'aucune craquelure ne survienne durant le passage à l'étuve (de 30 minutes à 1 heure). Après 30 minutes

de refroidissement, elles séjournaient dans un dessiccateur sous vide (10^{-2} torr) pendant au moins 10 heures.

Le dépôt des échantillons se fait avec des micropipettes de précision en évitant le contact avec la surface de la couche mince qui doit rester parfaitement plane et sans aucune irrégularité.

Pour les plaques 10 × 20, 4 échantillons par plaque au maximum sont déposés, ce qui permet d'éviter les effets de bords ainsi que les interactions entre les zones de migrations.

Un point très important est la saturation préalable des couches minces dans la cuve où aura lieu le développement. Cette saturation doit durer, suffisamment longtemps pour être complète, mais on doit à tout prix éviter de la prolonger trop, ce qui amène des perturbations importantes dans la migration des constituants des échantillons. Avec une cuve Shandon, à 22°C, à l'abri de tout courant d'air et en graissant abondamment le couvercle rodé, la saturation est faite en 20 minutes exactement. Déjà, pour 30 minutes de saturation, des perturbations sont notées.

Pour le solvant 1, la migration était stoppée à 9,5 cm de la ligne de dépôt des échantillons, puis on séchait à 80°C en étuve ventilée pendant 1 heure. La migration était de 10 cm pour les solvants 2 et 3 (éther-méthanol 95 : 5) ; le séchage s'effectuait à 100°C pour le solvant 2 et à l'air libre pour le solvant 3. Le choix du solvant de l'échantillon doit être effectué avec soin, en fonction du système utilisé pour le développement ; après dessiccation de l'échantillon il était repris par du chloroforme pour le système 2 et de l'éther dans le cas du système 3.

La lecture était identique à celle des chromatogrammes sur papier, avec l'inconvénient de ne pas pouvoir dessiner facilement les taches fluorescentes pour leur repérage ultérieur. Il faut en effet lire rapidement le résultat car au bout de 7 jours il y a une diminution très importante de la fluorescence. Les mesures de R_F sont donc effectuées dans ce cas immédiatement sous la lampe à ultra violet ; une fois la technique de prise de vue mise au point des photographies en couleur des plaques ont été systématiquement faites.

3° Chromatographie sur colonne :

Le protocole maintenant classique de SEAR-GEANT (30) a été suivi, en utilisant l'alumine neutre Prolabo.

4° Photographie des chromatogrammes :

Pour que les clichés soient intéressants, ils devaient satisfaire aux conditions essentielles suivantes : reproduire de façon satisfaisante les couleurs et l'intensité relative des différentes taches fluorescentes sur les chromatogrammes. Il est en effet des plus importants de pouvoir comparer des chromatogrammes effectués à des époques différentes.

Un dispositif très simple que tout laboratoire équipé d'une lampe à ultraviolet mobile et orientable peut réaliser (fig. 3) a été utilisé.

Il fallait prendre des clichés d'ensemble qui rendent au minimum les mêmes services que la conservation des plaques de chromatogrammes. A cet effet, nous utilisons un appareil de prise de vue muni d'un objectif Planar 2 : 50

qui permet de couvrir le champ total des chromatogrammes sur plaques 10×20, en opérant avec une distance objet-plan du film de 31 cm. On obtient une représentation aussi exacte que possible des couleurs en arrêtant la lumière ultra violette réfléchie par trois filtres associés ou non, 1 filtre Kodak-Wratten 1 A et 2 filtres K. W. 2 B.

Ces filtres 76,2 × 76,2 mm, difficiles à présenter isolés devant l'objectif, sont maintenus dans une seule monture professionnelle K. n° 2 (76 × 76) en ne serrant pas à fond le cadre de plastique pour éviter la formation d'anneaux de NEWTON entre les surfaces de gélatine en contact. Le tout est glissé dans le porte-filtre K. n° 2 muni d'un pare-soleil qui joue ici un rôle important en éliminant les fortes fluorescences parasites suscitées par la source d'ultraviolet. Rappelons à ce sujet que les blouses sont fortement fluorescentes, il convient donc de se maintenir éloigné de la plaque au moment de la prise de vue.

Le problème résolu n'était pas l'élimination

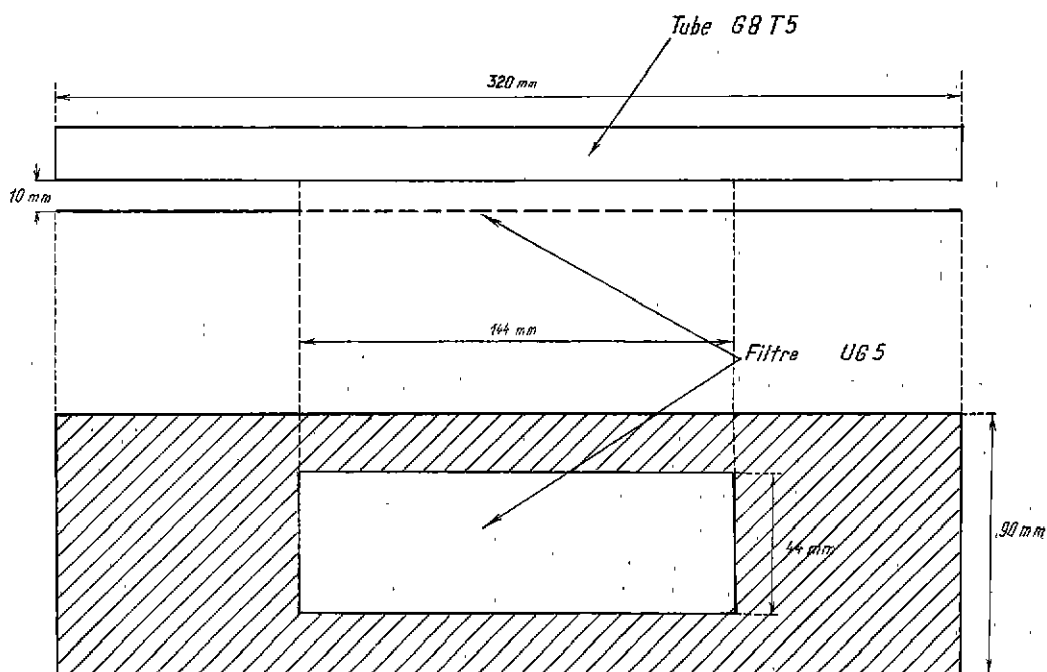


Fig.1. Disposition de la source d'ultra-violet

des radiations dans le proche ultraviolet, déjà en partie filtrées par les lentilles de l'objectif mais de faire disparaître la dominante bleu-violette qui voile entièrement la pellicule en bleu sans filtrage correct. Nous devons aussi signaler le fait que l'émission fluorescente est très faible comparée au rayonnement de la lampe U. V.

Les caractéristiques du tube émetteur sont réunies fig. 1. C'est un tube « Sylvania germicidal » G. 8 T. 5, 8 W avec un filtre Schott et Gem U. G. 5. La répartition spectrale de la source (fig. 2) est suffisamment étroite pour qu'on puisse parler d'une excitation de la fluorescence à 350 m μ . On pourrait croire que le choix du type de pellicule utilisée serait à faire au moyen d'une mesure thermocolorimétrique ; mais d'une part la source d'ultraviolet n'émet de radiations que dans une bande étroite de longueur d'onde, d'autre part l'usage d'un thermocolorimètre avec une source de lumière non incandescente est particulièrement délicat. Pourtant des mesures faites à 2 cm du filtre UG 5 ont donné 174 mireds, soit la même valeur que pour la lumière du jour. Il ne peut s'agir là que d'une simple coïncidence, mais il est certain que ce sont les pellicules type lumière du jour qui ont donné entière satisfaction.

Les prises de vues se font dans l'obscurité totale. L'axe de la source étant disposé immuablement à 15 cm du centre du chromatogramme et en utilisant des pellicules Kodachrome II type lumière du jour (filtrage 1 A + 2 \times 2 B, émulsion 186-7) de 25 ASA, la pose a varié de 80 à 100 secondes selon la distance objet-plan du film (80 secondes pour 31 cm) avec un diaphragme de 5,6.

L'intérêt d'un diaphragme relativement fermé réside dans la grande marge ainsi laissée pour le réglage du parallélisme entre l'objet et le plan du film. La mise au point téléométrique est obligatoirement effectuée à la lumière artificielle sous un éclairage d'au moins 50 lux. Le flux d'ultraviolet est important : 400 lux à 17 cm de l'axe du tube, mesurés avec le filtre UG 5.

La pellicule Ektachrome H. S. type lumière du jour, émulsion 462-3 (en 35 mm aussi, sensibilité 160 A. S. A.) qui présente l'avantage de pouvoir être développée sur le champ a été utilisée avec succès. Toutes les autres conditions étant inchangées il faut poser de 0,5 à 2 se-

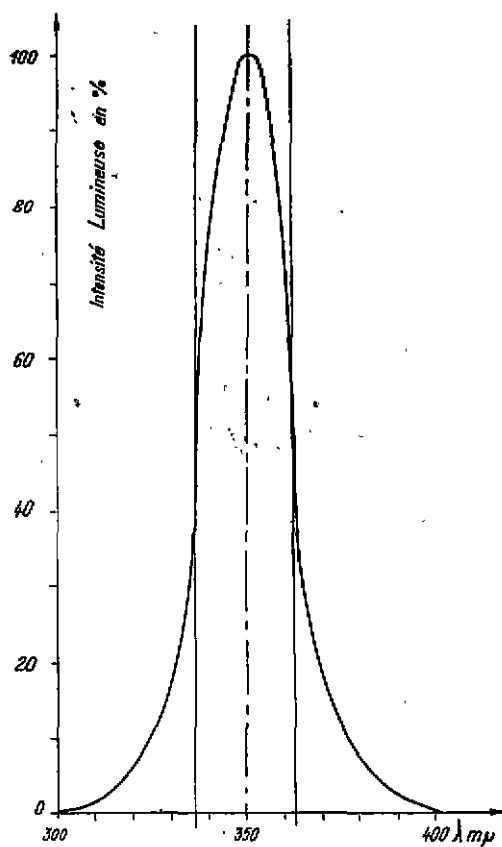


Fig. 2 Répartition spectrale de la source d'ultra violet.

condes avec un filtrage moins important : 2 \times 2 B seulement (1 seconde pour 31 cm).

Les spots trop faibles ne peuvent pas être révélés car un temps de pose exagéré amène des dominantes jaunes qui nuisent à l'interprétation du cliché.

Les résultats obtenus sont satisfaisants surtout pour les clichés Ektachrome qui permettent une meilleure restitution des teintes de la fluorescence observée à l'œil nu. En particulier, on parvient à approcher la teinte du spot bleu-violet de l'aflatoxine B. Celui-ci a malheureusement une couleur assez voisine de celle de la couche mince sous lumière ultraviolette.

Ce problème continue à être étudié pour parvenir à restituer exactement les couleurs observées en laissant à la médiocre appréciation visuelle des nuances dans les bleu-violet intenses

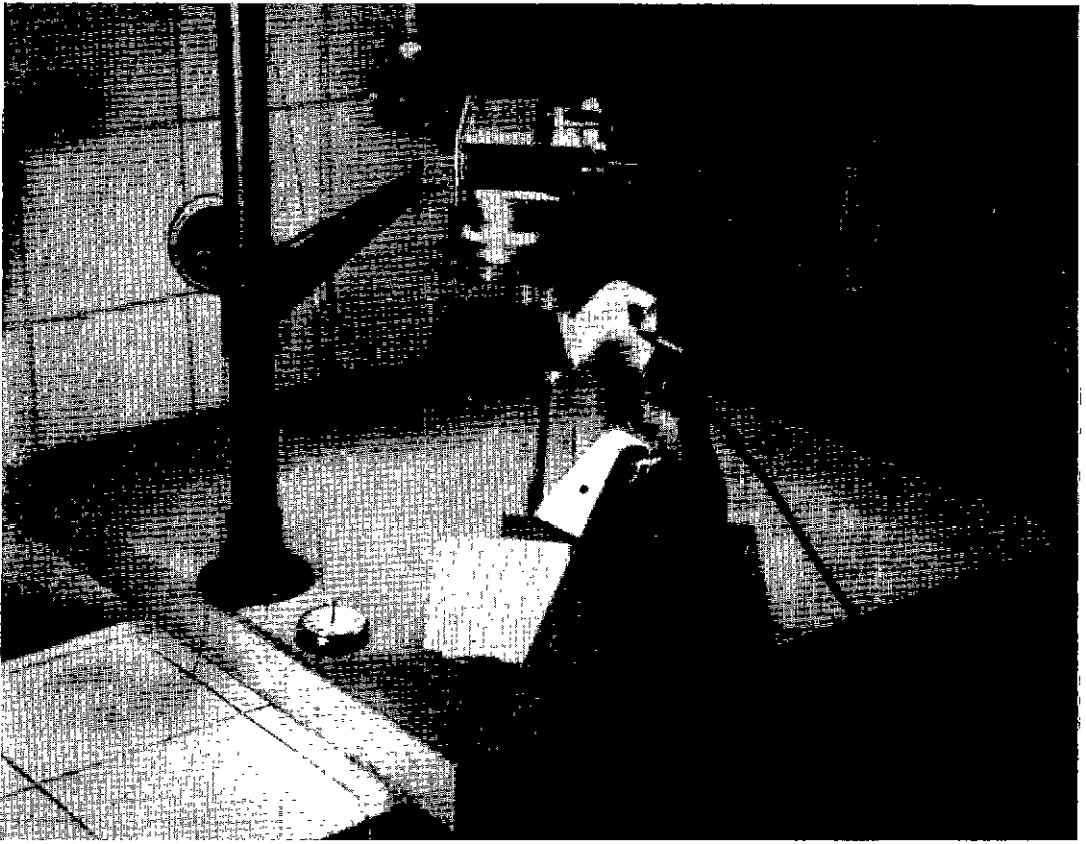


Fig. 3. — Dispositif de prise de vues en éclairage ultraviolet.

la part qui lui revient dans la différence constatée entre ce qui est vu et ce qui est photographié.

Par contre la pellicule Kodachrome II transforme ici les spots en verts variés, à cause du filtrage 2 B imposé ; à la lumière des résultats obtenus avec la pellicule Ektachrome, un temps de pose très inférieur de l'ordre de 8 à 10 secondes devrait permettre d'obtenir une meilleure restitution des teintes avec le Kodachrome II.

Il serait particulièrement intéressant de se servir des clichés pour effectuer des mesures en photométrie directe ; on obtiendrait ainsi un graphique analogue aux densitogrammes de l'électrophorèse.

Cette méthode est tout à fait générale et peut permettre de très nombreux tests pour d'autres substances fluorescentes que l'aflatoxine isolées, par n'importe quelle méthode.

RÉSULTATS

1° Extraction finale du tourteau d'arachide et contrôle par chromatographie sur papier de A (extrait de tourteau d'arachide toxique).

L'extrait brut A révèle par chromatographie directe sur papier en solvant 1 deux taches fortement fluorescentes, dont l'une bleue-violette de R_F moyen égal à 0,58 (sur 8 chromatogrammes) correspond au spot de l'aflatoxine. Avec le solvant 2 on n'obtient qu'une tache de R_F moyen, égal à 0,90 donc sans signification précise.

C'est sur 3 g de cet échantillon A que nous avons réalisé l'extraction chloroformique terminale.

L'extrait brut A présente l'aspect d'un liquide très visqueux noir-brun, à odeur forte et acre, très hétérogène dès la fin des extractions préliminaires, ce qui ne convient pas pour une prise d'échantillon homogène. Il a été

repris par de l'éthanol absolu qui le solubilise parfaitement et permet d'obtenir un liquide très visqueux mais d'une homogénéité persistant après évaporation de l'éthanol.

Ceci prouverait soit un changement de la structure externe des molécules d'aflatoxine sous l'influence de ce solvant, sans pour autant modifier les résultats des chromatogrammes, soit un changement de ce qui accompagne la toxine dans les extraits.

Aux 3 g d'extrait A homogénéisé, 5 ml d'eau puis 15 ml de chloroforme sont ajoutés ; le mélange est agité pendant 20 minutes, puis laissé au repos pendant 15 mn. Deux couches se forment dont l'inférieure, homogène, constitue le 1^{er} extrait chloroformique et la supérieure, hétérogène, marron clair et trouble représente le 1^{er} extrait aqueux que l'on traite à nouveau de la même manière avec 15 ml de chloroforme R. P. Ceci permet d'obtenir en définitive (fig. 4) :

1^o 1^{er} extrait CHCl_3 .

2^o 2^e extrait CHCl_3 .

3^o Résidu aqueux final.

Ces trois solutions ont été testées par chromatographie sur papier pour vérifier la bonne extraction de l'aflatoxine. Le 1^{er} extrait chloroformique en solvant 1 donne deux taches fluorescentes migrant bien, dont l'une de R_F égal à 0,63 est bleue-violette. La migration s'effectue ici sans traînée différant en cela de l'extrait brut initial A ; les taches étant beaucoup moins allongées, la détermination de leur R_F est plus précise.

Les solutions 2 et 3 ne révèlent aucune tache lisible par cette technique ; en couche mince, des traces de fluorescence sont cependant observées.

Ce début de purification semble donc intéressant puisque des fractions fluorescentes non significatives sont éliminées et que l'on améliore ainsi la mise en évidence de celles qui restent dans l'extrait 1 ; celui-ci contient la quasi-totalité de l'aflatoxine révélée selon cette méthode.

La solution 1 (fig. 4) est reprise et passée sur une colonne d'alumine neutre activée Pro-labo (10 g pour 10 ml d'extrait 1). On contrôle qu'il n'y a aucune perte en aflatoxine lors de la charge de la colonne par les 10 ml de solu-

tion 1 : les 10 premiers millilitres sortant de la colonne après sa mise en charge en sont exempts.

On élue alors par 100 ml du mélange chloroforme, méthanol (95 : 5). L'éluat montre 2 taches de fluorescence caractéristique dont l'une de R_F égal à 0,64.

Cet éluat desséché puis repris par 10 ml de CHCl_3 révèle les mêmes taches, dont celle de R_F égal à 0,64. La technique de purification utilisée nous paraît donc très satisfaisante, peut-être pourrait-on l'améliorer du point de vue du rendement en aflatoxine en ce qui concerne l'échantillon A.

2^o Chromatographie sur papier des autres échantillons.

Echantillon B (extrait des cultures sur milieu liquide).

Les deux cultures révélaient 1 tache fluorescente bleue-violette de R_F égal à 0,082 qui ne peut être retenue comme valable.

Il peut donc être conclu soit que l'aflatoxine était absente des cultures ou existait sous une forme différente de celle que l'on rencontre dans les tourteaux avariés. Nous reparlerons de ces échantillons B, C et D plus loin.

Echantillons C et D (extraits des lots de manioc).

Les manipulations ont été exécutées dans ces essais sur des extraits non dégraissés.

Le 906 révèle seulement une traînée, le 907 une large tache très moyennement fluorescente de R_F égal à 0,56.

Nos conclusions seront donc les mêmes que pour les échantillons B, en ce qui concerne la chromatographie sur papier seulement, excepté pour le manioc moiisi 907 qui semble contenir un peu d'aflatoxine.

3^o Chromatographie en couche mince.

De tous les supports utilisés, celui qui a permis la fragmentation maximum du produit est le gel de silice avec liant « Camag » qui permet d'identifier 3 taches et 7 raies avec le 1^{er} éluat de la colonne d'alumine repris par du chloroforme. Avec le système de solvant 2 on obtient ainsi 2 raies minces de fluorescence bleue très intense et de R_F 0,48 et 0,55 et deux autres un peu plus floues, de fluorescence intense verte dont les R_F sont de 0,67 et 0,75. Les cher-

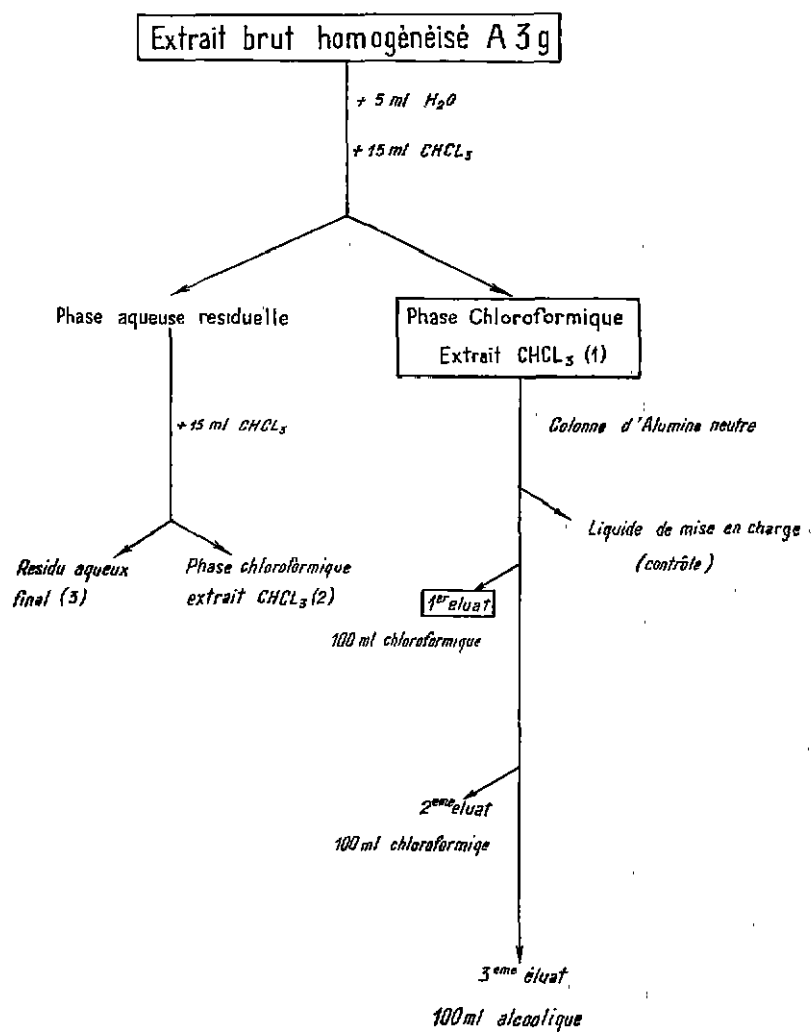


Fig. 4 Schéma de l'extraction finale

cheurs du T. P. I. ont abouti, pour leur part, au choix du même support.

Les travaux anglais permettent de penser qu'il s'agit là des aflatoxines G et B, ainsi mises en évidence assez simplement. Cette technique a permis de préciser l'effet de dose et aussi de suivre au cours des manipulations, en particulier après passage sur la colonne d'alumine neutre, le comportement des fractions obtenues (fig. 4).

a) Echantillons A (tourteau d'arachide toxique);

En ce qui concerne l'effet de dose, pour une

épaisseur de couche de 0,60 mm, on remarque (planche de photographies) peu de modifications pour l'extrait brut, les meilleures séparations étant obtenues pour 10 et 15 μ l d'échantillon (photographie n° 3). Pour le premier éluat chloroformique de la colonne on obtient aussi la meilleure résolution avec 10 et 15 μ l, mais dans ces cas, avec 45 μ l la séparation devient très mauvaise (photographie n° 2).

Pour mieux suivre l'extraction chloroformique de A (figure n° 4), le 1^{er} extrait chloroformique ainsi que la première phase aqueuse résiduelle, ont été comparés à cet extrait brut A (photogra-

PLANCHE

Photographie n° 1

Deux foies de canetons de la 2^e expérience, qui sont morts le 4^e jour après avoir reçu 1 g de tourteau complet le 1^{er} jour, 2 g les 2 et 3^e jour, 3,5 g le 4^e jour. L'un présente une dégénérescence atrophique d'autant plus évidente ici, que l'autre montre une dégénérescence hypertrophique.

Photographie n° 3

Cliché Kodachrome II Type Lumière du Jour.

Echantillons déposés :

D 20 µl extrait brut A	$R_F = 0,57$
C 15 µl extrait brut A	$R_F = 0,55$
B 10 µl extrait brut A	$R_F = 0,55$
A 5 µl extrait brut A	$R_F = 0,55$

Effet de dose sur l'extrait brut A provenant du tourteau toxique de Madagascar.

La résolution s'améliore de D en A au fur et à mesure que diminue la dose d'extrait déposée.

Photographie n° 5

Cliché Ektachrome H. S. Type Lumière du Jour.

Echantillons déposés :

D 20 µl du 3 ^e éluat éthanolique de la colonne d'alumine	$R_F = 0,34$
C 20 µl du 1 ^{er} éluat chloroformique d'une colonne d'alumine chargée de 0,5 g d'extrait brut A	$R_F = 0,50$
B 20 µl du 1 ^{er} éluat chloroformique d'une colonne d'alumine chargée de 3 g d'extrait brut A	$R_F = 0,50$
A 20 µl d'extrait brut A	$R_F = 0,55$

Intérêt du passage sur colonne d'alumine neutre Pro-labo et bilan des fractions obtenues.

On remarque surtout que toute la substance fluorescente se retrouve dans les 100 premiers ml d'éluat chloroformique (lignes B et C). Dans les 100 ml d'éthanol suivant (ligne D) on retrouve des fractions retenues par la colonne. Il faut aussi noter que selon la charge de la colonne d'alumine en extrait brut A, on purifie plus ou moins en principe toxique : ligne C on avait mis 0,5 g d'extrait A sur la colonne d'alumine et ligne B 3 g, la purification est bien meilleure en ligne C avec seulement 0,5 g d'extrait brut A pour 10 g d'alumine neutre.

Photographie n° 2

Cliché Ektachrome H. S. Type Lumière du Jour

Echantillons déposés :

C 45 µl du 1 ^{er} éluat chloroformique de la colonne	$R_F = 0,52$
B 30 µl du 1 ^{er} éluat chloroformique de la colonne	$R_F = 0,43$
A 15 µl du 1 ^{er} éluat chloroformique de la colonne	$R_F = 0,40$

Effet de dose sur le 1^{er} éluat chloroformique de la colonne d'alumine neutre. On peut remarquer la bonne résolution pour le dépôt de 15 µl (ligne A). La tache fluorescente bleue caractérisant selon les divers auteurs l'aflatoxine est hachurée et entourée de traits pleins

Les R_F qui sont indiqués correspondent à ce spot.

Photographie n° 4

Cliché Ektachrome H. S. Type Lumière du Jour.

Echantillons déposés :

C 20 µl du 1 ^{er} extrait chloroformique	$R_F = 0,52$
B 20 µl de la 1 ^{re} phase aqueuse résiduelle	$R_F = 0,38$
A 20 µl d'extrait brut A	$R_F = 0,48$

Intérêt de la première extraction chloroformique de l'extrait brut A avant le passage sur la colonne d'alumine neutre.

On remarquera particulièrement la très faible quantité de substance fluorescente présente dans la phase aqueuse.

Photographie n° 6

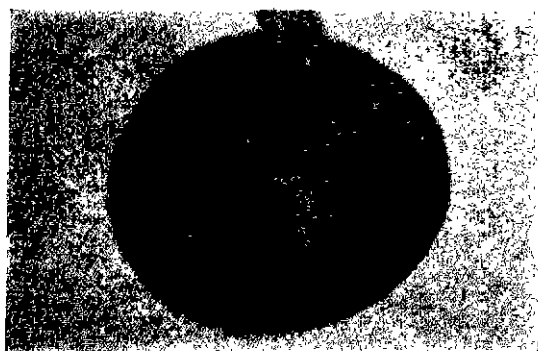
Cliché Ektachrome H. S. Type Lumière du Jour.

Echantillons déposés :

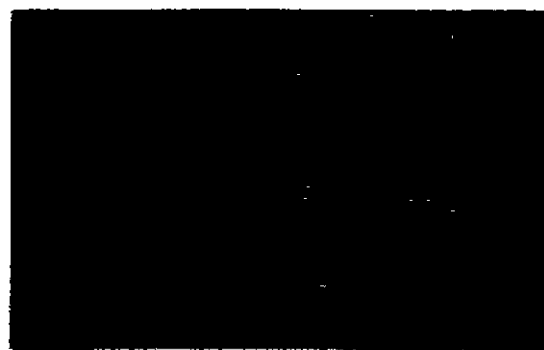
C 20 µl du 1 ^{er} éluat chloroformique d'une colonne d'alumine chargée de 3 g d'extrait A	$R_F = 0,54$
B 20 µl d'extrait chloroformique de la culture n° 3 d'Aflavus sur maïs grain	$R_F = 0,56$
A 20 µl d'extrait chloroformique de manioc mois n° 92	$R_F = 0,55$

Recherche d'aflatoxine dans des échantillons divers par la méthode de recherche de la fluorescence.

La forte intensité de la fluorescence dans l'extrait de culture du maïs grain est particulièrement intéressante.



Photographie n° 1



Photographie n° 2

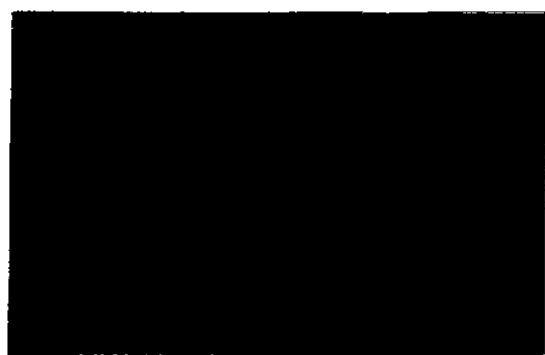
C

B

A

← Sens de la migration

Dépôt des échantillons



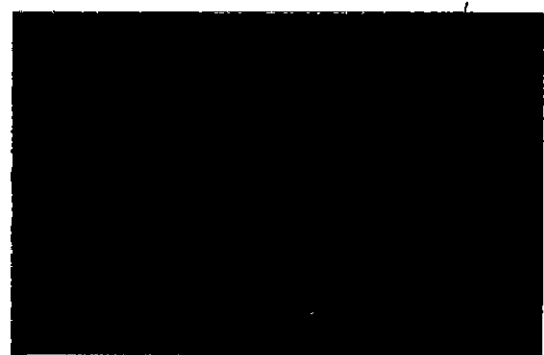
D

C

B

A

Photographie n° 3

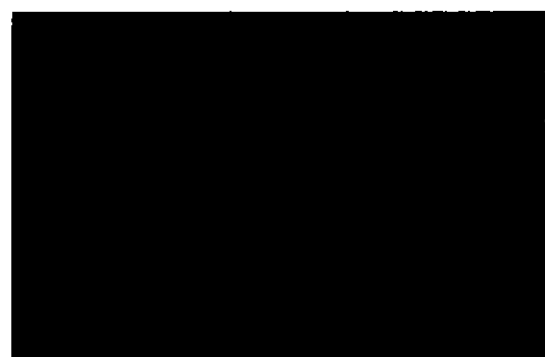


C

B

A

Photographie n° 4



D

C

B

A

Photographie n° 5



Front du solvant

C

B

A

Photographie n° 6

ERRATUM

Dans l'article paru dans le n° 1 (1964), pages 23-33 :
« **Recherches immunologiques sur la périlpneumonie** »
par A. PROVOST et Col., le tableau IX comporte une
erreur :

Dans la 2^e colonne les termes « Antisérum » et « Antigène »
ont été inversés.

Au lieu de « Antisérum » lire « Antigène »

Au lieu de « Antigène » lire « Antisérum »

VIGOT FRÈRES — ÉDITEURS — PARIS

JACQUES EUZÉBY

Docteur-Vétérinaire

Professeur de Parasitologie et de Clinique des Maladies Parasitaires
à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

LES ZONOSSES HELMINTHIQUES

Un volume (16×25), 390 pages, 154 figures. 1964 Cartonné. 70 F

A côté des Zoonoses bactériennes et virales, les Zoonoses parasitaires prennent une place de plus en plus reconnue. Parmi celles-ci, les Zoonoses helminthiques sont, sans aucun doute, les plus importantes de par leur fréquence et la gravité de certaines d'entr'elles.

L'étude qu'en présente le Professeur J. EUZÉBY s'inscrit dans le cadre du Précis d'helminthologie clinique que l'auteur a entrepris de rédiger. L'ouvrage est avant tout consacré à l'épidémiologie, à l'étiologie et aux mesures générales de prophylaxie des Zoonoses helminthiques, étudiées d'abord sur le plan analytique, puis présentées d'un point de vue synthétique. Il s'adresse aussi bien aux Médecins qu'aux Vétérinaires et d'une façon générale, à tous les Épidémiologistes.

INTRODUCTION — REMARQUES SUR LES SCHÉMAS DES CYCLES ÉVOLUTIFS — ÉTUDE ANALYTIQUE DES ZONOSSES HELMINTHIQUES.
A. — Nématodoses. B. — Acanthocéphaloses. C. — Cestodes. D. — Trématodoses. EXPOSÉ SYNTHÉTIQUE DES ZONOSSES HELMINTHIQUES — Les types cliniques et anatomiques des helminthoses d'origine animale. Étiologie et épidémiologie générale des helminthoses humaines d'origine animale. Les règles générales de la prophylaxie des helminthoses humaines d'origine animale.

phie n° 4). On voit aisément l'effet purificateur de ce solvant et la faible teneur en aflatoxine de l'extrait aqueux ; celle-ci provient d'ailleurs de la saturation de la phase aqueuse en chloroforme ayant dissout de la toxine.

Sur la photographie n° 5, à l'extrait brut et au troisième éluat, sont comparés deux premiers éluats de colonne relatifs à 3 g (ligne B) et 0,5 g (ligne C) d'extrait brut. Une différence importante peut être mise en évidence non pas dans les R_F , qui changent peu, mais dans le nombre de spots fluorescents quand la colonne est surchargée : il passe certaines impuretés qui autrement peuvent être retenues. Pour 0,5 g d'extrait brut, la correspondance qualitative entre les fractions du 1^{er} et du dernier éluat est bonne. On vérifie que seul le premier éluat chloroformique contient la majorité de l'aflatoxine ; en effet, le 2^e éluat chloroformique ne révèle aucun spot fluorescent. Le 3^e éluat obtenu avec 100 ml d'éthanol absolu permet une récupération facile des constituants fixés sur la colonne.

Dans tous ces résultats, seules ont été retenues comme significatives de la présence d'aflatoxine les taches bleues-violettes de R_F compris entre 0,6 et 0,5 (avec le solvant 2 et seulement dans le cas de la chromatographie en couche mince).

b) **Pour les échantillons B** (extraits de culture en milieu liquide) au contraire de ce qui était observé sur papier, était notée, une tache bleue-violette, de R_F égal à 0,51 peu intense mais caractéristique de l'aflatoxine.

c) **Pour les échantillons C** aussi (manioc moisi) était obtenue une tache de R_F égal à 0,55 bleu-violet dont la fluorescence pourrait être notée avec deux croix, selon les notations usuelles (Photographie n° 6, ligne A). Des extraits bruts non dégraissés dans les premières phases de l'extraction peuvent donc être utilisés, mais il faut absolument les reprendre dans le chloroforme après dessiccation pour obtenir une migration normale par chromatographie en couche mince (solvant n° 2).

d) **Les extraits chloroformiques de chacun des échantillons D** (culture sur maïs), ont montré une fluorescence bleue-violette très intense (5 +) de R_F égal à 0,56 (photographie n° 6, ligne B).

Cette culture semblait donc riche en produits toxiques, du seul point de vue du test de fluorescence.

COMMENTAIRES ET CONCLUSIONS

Il est certainement prématuré de tirer des conclusions définitives ou même trop générales de ces quelques expériences. Il est néanmoins possible de faire quelques constatations, qui pourront servir pour les recherches ultérieures.

1^o Des canelons peuvent survivre à des doses d'extrait brut obtenu par traitement des tourteaux au méthanol correspondant à des quantités énormes de tourteau toxique, tandis que d'autres meurent par ingestion d'une quantité de tourteau complet *vingt fois* moindre.

L'homogénéisation des extraits permet de réduire notablement sans toutefois la supprimer cette différence de dose mortelle entre l'extrait brut et le tourteau complet.

Pourrait-on incriminer la technique d'extraction ? N'entraînerait-elle pas la totalité de l'aflatoxine ? Ou modifierait-elle sa structure ? Autant de questions qui restent sans réponse, pour le moment, de même que celle de savoir si les tourteaux contiennent ou non d'autres substances toxiques non extraites par les méthodes « classiques ».

Le solvant d'extraction mériterait à lui seul d'importantes recherches visant à déterminer celui qui retiendrait le plus d'aflatoxine et le moins d'impuretés.

2^o Les résultats obtenus avec les cultures semblent assez décourageants du moins si l'on emploie exclusivement le test biologique pour la détection de la toxine en s'en tenant à la mortalité enregistrée.

Par contre, le test de fluorescence permet de révéler la présence de quantité notable d'aflatoxine, ce qui est particulièrement net avec la culture sur maïs.

3^o Il semble aussi que la production d'aflatoxine varie avec les souches d'*Aspergillus*, qui pourraient sans doute se classer selon leur toxicité ; la conservation des souches, la sélection

tion des mutants très toxiques et les milieux « révélateurs » du pouvoir toxigène constituent des domaines de recherches des plus intéressants.

4° Extraction finale :

Le protocole utilisé ici et mis au point par les chercheurs du T. P. I. semble tout à fait satisfaisant ; une nouvelle méthode a cependant vu le jour, décrite par NESHEIM (39) qui utilise une colonne de célite. La manipulation, légèrement plus délicate, améliorerait sensiblement les rendements en aflatoxine.

5° Fluorescence :

Nous considérons maintenant la chromatographie sur papier comme nettement insuffisante pour révéler l'aflatoxine et nous lui préférons la technique en couche mince beaucoup plus sensible et aussi plus fidèle si l'on s'entoure de grandes précautions pour réaliser un protocole rigoureusement identique. Il faut toujours garder présent à l'esprit que de très faibles changements dans les conditions expérimentales se traduisent sûrement par d'importantes perturbations dans les migrations.

On notera le parallélisme qui existe dans nos expériences entre les deux tests, biologique et de fluorescence quand on s'adresse aux

tourteaux toxiques. Pour les cultures sur maïs il peut sembler qu'une discordance intervienne ; dans ce dernier cas, il s'agirait plutôt d'une corrélation entre les deux tests, en fait l'examen histologique des foies des canetons sacrifiés a montré des phénomènes dégénératifs très nets et une cirrhose débutante possédant les caractères habituels des cirrhoses rencontrées chez les oiseaux intoxiqués par l'aflatoxine.

Il en ressort que ce maïs moisi contenait bien de l'aflatoxine, mais en quantité insuffisante pour provoquer une intoxication aiguë.

Enfin il faut être particulièrement prudent en ce qui concerne les fausses fluorescences, et on ne saurait trop insister sur la nécessité de réaliser des témoins internes au moyen d'aflatoxine purifiée, cristallisée si possible.

Ces travaux ne représentent qu'un début de recherches. Les nombreux programmes consacrés à ce sujet semblent justifiés par l'ampleur des conséquences économiques de la présence d'aflatoxine dans de nombreux produits alimentaires, qu'ils soient destinés aux animaux ou aux humains.

*Institut Elevage et Médecine vétérinaire
des Pays tropicaux
Laboratoires centraux de Microbiologie
Chimie alimentaire
Biochimie*

SUMMARY

RESEARCHES ON AFLATOXIN Review of research works carried out at the I. E. M. V. T. central Laboratories during the first half of the year 1964

At the I. E. M. V. T. central Laboratories, the workers' research object to allow further toxicological and pharmacological studies. Different aflatoxin formations are considered, especially maize grain cultures that produced toxin.

The extraction methods with all the stages and the means to homogenize the raw extract by absolute ethyl alcohol are indicated ; two tests are described to detect toxicity and to check the degree of extraction and purification : a biological test on ducklings and a physico-chemical test by fluorescence after chromatographic-analysis. With a simple method, the fluorescent chromatograms are photographed and the authors set examples of this carrying out. The results obtained can be classified, constantly revised, compared, and R_F accurate measures planned on a screen.

This technic is particularly effective associated with thin layer chromatographic-analysis, the methods of which are analysed from the point of view of the result reproducibility. By comparison of all the data, the technics used for further researches on this economic important subject are perfecting.

RESUMEN

INVESTIGACIONES SOBRE LA AFLATOXINA

Revista de las búsquedas hechas en los Laboratorios centrales del I.E.M.V.T. durante la primer mitad del año 1964.

Las búsquedas hechas en los laboratorios centrales del I. E. M. V. T. tenían por objeto permitir estudios toxicológicos y farmacológicos ulteriores.

Diferentes fuentes de aflatoxina están consideradas, particularmente culturas sobre granos de mais que produjeron la toxina. Se indican los métodos de extracción con todos los estados y el medio para hacer homogéneo el extracto mediante el etanol absoluto.

Para determinar la toxicidad y para seguir las extracciones y las purificaciones, dos series de pruebas son descritas : biológica sobre anadones y fisico-química por fluorescencia luego de cromatografía. Se describe un método simple para fotografiar los cromatogramas fluorescentes y se dan ejemplos de lo que este permite obtener. Así se puede archivar los resultados obtenidos, volverlos visibles en el tiempo, compararlos y efectuar, mediante proyección sobre una pantalla, medidas precisas de R_F .

Esta técnica es particularmente eficaz ligada con la cromatografía cuyas modalidades están analizadas desde el punto de vista de la reproducibilidad de los resultados obtenidos. La confrontación de los datos de todas estas análisis permite una mejora de las técnicas a utilizar para investigaciones futuras sobre este asunto particularmente importante en cuanto a la economía.

BIBLIOGRAPHIE

1. WAKSMAN (S.), HORNING (E.) et SPENCER (E.). — Two antagonist fungi *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus clavatus* and their antibiotic substances. *J. Bact.* 1942, **45**, 233-248.

Année 1961:

2. ALLCROFT (R.), CARNAGHAN (R. B. A.), SARGEANT (K.) et O'KELLY (A.). — Toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.* 1961, **73** (17) : 428-429.
3. ASPLIN (F. B.), CARNAGHAN (R. B. A.). — The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Vet. Rec.* 1961, **73** (46) : 1215-1219.
4. BLOUNT (W. P.). — Turkey « X » disease. *J. Brit. Turkey Fed.* 1961, **9** : 52-61.
5. CARNAGHAN (R. B. A.), SARGEANT (K.). — The toxicity of certain groundnuts meals to poultry. *Vet. Rec.* 1961, **73** (29) : 726-727.
6. LOODMORE (R. M.), HARDING (J. D. J.). — A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. *Vet. Rec.* 1961, **73** (49) : 1362-1364.

7. RAYNAUD (J. P.). — Une épidémie d'hépatite cirrhotique du porc sévissant à Madagascar. I. Etude des tests hépatiques chez le porc et utilisation de la vitesse de sédimentation pour un diagnostic précoce. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1961, **16** (4) : 429-437.

8. SARGEANT (K.), O'KELLY (J.), CARNAGHAN (R. B. A.), ALLCROFT (R.). — The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Vet. Rec.* 1961, **73** (46) : 1219-1223.

Année 1962

9. DE IONGH (H.), BEER THUIS (R. K.), VLOS (R.), BARRET (C. B.) et ORD (W. O.). — Investigations of the factor in groundnut meal responsible for « turkey X disease ». *Bioch. et Biophys. Acta* 1962, **65** : 543-551.
10. GRACIAN (J.), MARTEL. — La fluorescencia de los aceites de oliva y orujo en el ultravioleta. *Grasas y aceites* 1962, **13** (3).
11. LE BRETON (E.), FRAYSSINET (Ch.), BAY (J.). — Sur l'apparition d'hépatomes « spontanés » chez le rat Whistar. Rôle de la toxine d'*Aspergillus flavus*. *C. R. Soc. Biol.* 1962, (255) : 784-786.

12. Mc. LARNON (J.). — Détection of *A. flavus* toxin in meal. Fluorescent test used successfully. *Chem. and Ind.* 1962, (33) : 1490.
 13. NESBITT (B. F.) et Al. — Toxic metabolites of *A. flavus*. *Nature* 1962, 195 (4846) : 1062-1063.
 14. Report n° 36/62. — The detection and estimation of Aflatoxin in groundnut materials by a paper chromatographic procedure. *T. P. I.* Report n° 36 (1962).
 15. SMITH (R. H.) et Mr. KERNAN (W.). — Hepatotoxic action of chromatographically separated fractions of *Aspergillus flavus* extracts. *Nature*, 1962, 195, 4848 : 1301-3.
 16. TILDEN (E. B.). — Preparation and properties of endotoxin of *A. flavus*. *Mycopath. Mycol. appl.*, 1961, 14, 325.
 17. WYNSTON (L. K.) et TILDEN (E. B.). — Chromatographic purification of aspergillus endotoxins. *Fed. Amer. Soc. Expt. Biol. Fed. Proc.* 21 (2) : 406 Mar. Apr. 1962.
- Année 1963
18. ARMBRECHT (B. K.), HODGES (F. A.), SMITH (H. R.) et NELSON (A. A.). — Mycotoxins. I. — Studies on Aflatoxin derived from contaminated peanut meal and certain strains of *Aspergillus flavus*. *Assoc. Off. agr. Chem. J.* 1963 (46) N° 5 : 805-817.
 19. ASAO (T.), BUCHI (G.), ABDEL KADER (M. M.), CHANG (S. B.), WICH (E.), WOGAN (G. N.). — Aflatoxin B and G. *J. Americ. Chem. Soc.* 1963, 11 (85) : 1706-1707.
 20. BLOUNT (W. P.), FRASEE (DM. C. K.), KNIGET (D.) and DOWLING (W. M.). — The use of ducklings for the detection of Aflatoxin. *Vet. Rec.* 1963, 75 (1) : 35.
 21. BROADBENT (J. H.). — A thin layer chromatographic methods analyst. 1963 (88) n° 1044 : 209-216.
 22. CARNAGHAN (R. B. A.), HARTLEY (R. D.) et O'KELLY (J.). — Toxicity and fluorescence properties of the Aflatoxin. *Nature London.* 1963 (200) 4911, 1101.
 23. COOMES (T. J.), SANDERS (J. C.). — Detection of Aflatoxin in groundnut and groundnut material and assessment of toxicity level. I. — Paper chromatography. *The analyst* 1963, 88 (1044) : 200-213.
 24. DELASSUS. — Compte rendu sur la toxicité de certains lots d'arachide du Sénégal. *I. R. A. T.* Rapport de Mission 1963.
 25. DUPONT DE DINECHIN (B.). — Les moisissures toxiques de l'arachide au Sénégal. Rapport de stage Centre de R. agr. de Bambey 1963.
 26. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Sur les propriétés antibiotiques et toxiques d'*Aspergillus clavatus* Desmazières. *C. R. Acad. agric. F.* 1963, 49 (5) : 368-373.
 27. LAFONT (A.). — Production of *Aspergillus* toxins in vitro (abs). London 1. p. Processed. Presented at the UNICEF Mtg on groundnut toxicity problems at T. P. I. 28-29, 1963.
 28. NEWBERNE (P. A.), CARLTON (W. W.). — Hepatic changes in ducklings after feeding certain peanut meal. *Fed.* 1963, 22 : 262.
 29. RAYNAUD (J. P.). — Une dystrophie hépatique toxique du porc à Madagascar. 2. — Etude clinique, lésions, reproduction expérimentale par ingestion de tourteau d'arachide. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1963, 16 : 23-32.
 30. SARGEANT (K.), CARNAGHAN (R. B. A.) et ALLCROFT (R.). — Toxic products in groundnuts. *Chemistry and origin Chemistry and Industry* 1963 (2) : 53-55.
 31. SERRES (H.) et al. — La toxicité de certains tourteaux d'arachide à Madagascar. *Bull. Madagascar* 1963 (209) : 575-580.
 32. SPENSLEY (C. P.). — Aflatoxin, the active principle in turkey « X » disease. *Endeavour* 1963, 22 (86) : 75-79.
 33. THEODOSSIADES. — Le caneton réactif biologique pour le dépistage de la toxicité des tourteaux d'arachide. *Rev. Elev. Méd. vét.* 1963, 16 (2) : 229-236.
 34. TOURY (J.). — Rapport d'étude sur la contamination des arachides par *Aspergillus flavus*. *O. R. A. N. A.* Ronéotypé 46 pages.
 35. TOURY (J.), DUPIN (H.), CROS (J.), RICHIR (Cl.). — Contaminations alimentaires par *Aspergillus flavus*. *Rev. Gén. Pat. et Biol. Mars* 1963 (5-6) : 346-351.
 36. TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE. — A method for the detection of aflatoxin in groundnuts and groundnuts products. *T. P. I.* Report n° 30/62.
 37. UNICEF MEETING ON GROUNDNUT TOXICITY PROBLEMS LONDON 1963. —

Summary of proceedings of Unicef Meeting... held at T. P. I. (Tropical Products Institute) on 28-29 octobre 1963 (50 p.) processed.

38. WOGON (G. N.), ABDEL KADER (M. M.), WICK (E. L.) et CHANG (S. B.). — **Toxic metabolites produced by *Aspergillus flavus*.** *Amer. Chem. Soc. Abs Papers.* 145 th, Mtg 5 A. Sept. 8-13. 1963.

Année 1964

39. NESHEIM (S.), BANES (D.), STOLOFF (L.)

et CAMPBELL (A. D.). — **Note on Aflatoxine analysis in peanuts and peanuts products.** *J. of the A.O.A.C.* 1964, 47 (3) : 586.

40. RICHIR (Cl.), GROS (J.), DUPIN (H.). — **Le problème des toxicoses fongiques.** *Concours médical* 1964 (3) : 371-375.
41. RICHIR (Cl.), TOURY (J.), MARTINEAUD (M.), GIORGI (R.), DUPIN (H.). — **Observations sur des accidents de toxicoses fongiques survenus dans des élevages de canetons au Sénégal.** *Société de Biol.* Janvier 1964 à paraître.